云 南 植 物 研 究 5(4): 423—430, 1983
Acta Botanica Yunnanica

# 水稻叶绿体基粒缺乏突变体的叶绿素蛋白质复合体分析

胡 忠
(中国科学院昆明植物研究所)

我们曾报道一个细胞核隐性基因控制的黄绿色水稻突变体[3]。其叶片的叶绿素含量仅为正常品种叶片的1/3，Chla: Chlb 比值很高；叶绿体缺乏基粒，即基粒数和每一基粒的片层数均很少；但以叶绿素量为基数的光合活性较高[4]。为了认识色素含量、基粒结构和光合功能之间相互关系，对正常品种和突变体叶绿体膜的叶绿素蛋白质复合体作了比较分析。结果表明，突变体缺乏24KD的捕光叶绿素a/b蛋白质复合体，但富有28KD的叶绿素 a 蛋白质复合体CPa。从试验结果推论，叶绿体片层的垛叠和捕光叶绿素a/b 蛋白质复合体的含量有正的相关，非垛叠片层则富有叶绿素 a 蛋白质复合体 CPa；基粒缺乏突变体在较高光照强度下以叶绿素量为基数显示较高的光合活性是由于叶绿体中光系统Ⅱ反应中心的相对含量较高。本文还对各叶绿素蛋白质复合体在分离条件下的稳定性作了比较观察。

## 材 料 与 方 法

**1.材料** 供试验材料均为在温室中由种子长成的稻苗，4—6叶期，取新鲜叶片作分析。突变体HY 101 是本实验室繁殖的第6代种，该突变体是由化学诱变产生的稳定变种[3]。对照为正常水稻品种8126。二者同时播种并生长在同等肥力下。

**2.叶绿体膜和叶绿素蛋白质复合物的制备** 参照 Markwell(1978) 的方法[12]。5 g 鲜叶剪成碎块、加50ml提取缓冲液，其成分是0.4*M*山梨糖、0.1*M*三（羟甲基）甲基甘氨酸（Tricine)、0.1*mM* NaCl, pH7.0。在 4 °C用高速组织捣碎机匀浆 2 分钟，过 6 层纱布，再经10000 × g 冷冻离心10分钟。沉淀悬于20ml含有1*mM* EDTA 50*mM* Tris, pH8.0的溶液中，12000 × g 离心10分钟。沉淀再悬于 10ml 上述成分溶液，取样测定叶绿素量。悬液经 20000 × g 离心15分钟所得绿色沉淀即为叶绿体膜。根据所测的叶绿素量，加一定量含有SDS 1 %、6.2*mM* Tris、48*mM*甘氨酸，pH8.0的增溶溶液，使SDS: Chl=10:1（W/W），在 4 °C匀浆，经36000 × g 离心10分钟，上层即为叶绿体膜的SDS 增溶溶液。新鲜制备的样品即加于凝胶柱上分离，样品在室温下放置不超过 4 小时。

本文于1983年 4 月 9 日收到。

**3.聚丙烯酰胺凝胶电泳** 参照Marrwell(1978)方法[12]，略加修改。分离胶的成分为，丙烯酰胺7.5%、bis 0.16%、过硫酸铵0.1%、TEMED0.1%、SDS0.1%，缓冲成分为12.4*mM* Tris和96*mM*甘氨酸，pH8.5。电极缓冲液成分为，6.2*mM* Tris、48*mM*甘氨酸、SDS 0.1%，pH8.0。胶柱0.9×10cm，每管加SDS增溶溶液样品10μl。电泳电压100V，电流每管3mA。电泳时间依试验要求而定。电泳后，胶柱立即用岛津CS-910薄层扫描仪于675nm波长作光密度扫描，并由微处理机根据扫描中各吸收峰面积得出各叶绿素蛋白质色带所占的叶绿素相对含量（%），以此作为各个组分在叶绿体膜中的含量。此外，在脱胶后切下各色带胶段，置Specord UV-Vis分光光度计上扫描得到吸收光谱，该仪器所绘光谱图横坐标是波数线性尺度。

胶柱还用考马氏亮兰R 250染色以显示蛋白质带，脱色后于595nm波长作光密度扫描。蛋白质带的分子量估计是用分子量已知的蛋白质作比较：核糖核酸酶（13700）、胰蛋白酶（23300）和牛血清蛋白（67000）。这些蛋白质用含SDS 1%、6.2*mM* Tris、48*mM*甘氨酸、pH8.0的溶液溶解，加1%巯基乙醇，于沸水浴中3分钟，然后和叶绿体膜SDS增溶溶液在相同条件下同时电泳。

**4.叶绿素测定** 按Arnon（1949）方法[8]。用1.0×5.0cm胶柱进行电泳，将所分离的各色带胶段切碎，放在电泳管中，下端盖以一层透析膜，置于与原来相同条件下于10°C电泳，色素蛋白自胶柱中泳动至透析膜上浓缩，吸出，使转成80%丙酮溶液，按Arnon方法测定并计算叶绿素a和b含量。

## 结 果 与 分 析

**1.凝胶电泳柱的色带组分** 据表1测定结果，突变体叶片以单位鲜重计的叶绿素含量约为正常叶片的1/3，Chl a/Chl b比值显著比正常叶片高。按本文所述程序，从突变体叶片制备叶绿体膜的得率与正常叶片相近，因此从突变体单位鲜重叶片所制得的叶绿体膜要少得多，但叶绿体膜及其SDS增溶溶液的Chl a/Chl b比值仍表现出二种材料叶片之间的差异。

表1 水稻正常品种和突变体叶片、叶绿体膜及其SDS提取液的叶绿素含量的比较

| 材料 | 叶片 | | 叶绿体膜 | | SDS—提取液 | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Chl(a+b) (mg/g) | Chl a/Chl b | Chl(a+b) (mg/g鲜叶) | Chl a/Chl b | Chl(a+b) (mg/ml) | Chl a/Chl b |
| 正常品种 | 4.29 | 2.90 | 0.94 | 2.85 | 0.71 | 2.98 |
| 突变体 | 1.33 | 4.52 | 0.24 | 4.89 | 0.51 | 6.50 |

用电泳分离方法，从正常水稻叶绿体膜SDS提取物可分离出6条色带(图1，1)。其中含量大的三条。迁移率最小的CPⅠ呈蓝绿色，吸收光谱可见叶绿素a吸收峰，即短波区440nm，长波区676nm（图2，1），未见含Chl a，是Thornber（1975）所称的$P_{700}$叶绿素a蛋白质复合物[13]。含量最大的CPⅡ—3带呈黄绿色，吸收光谱可见叶绿

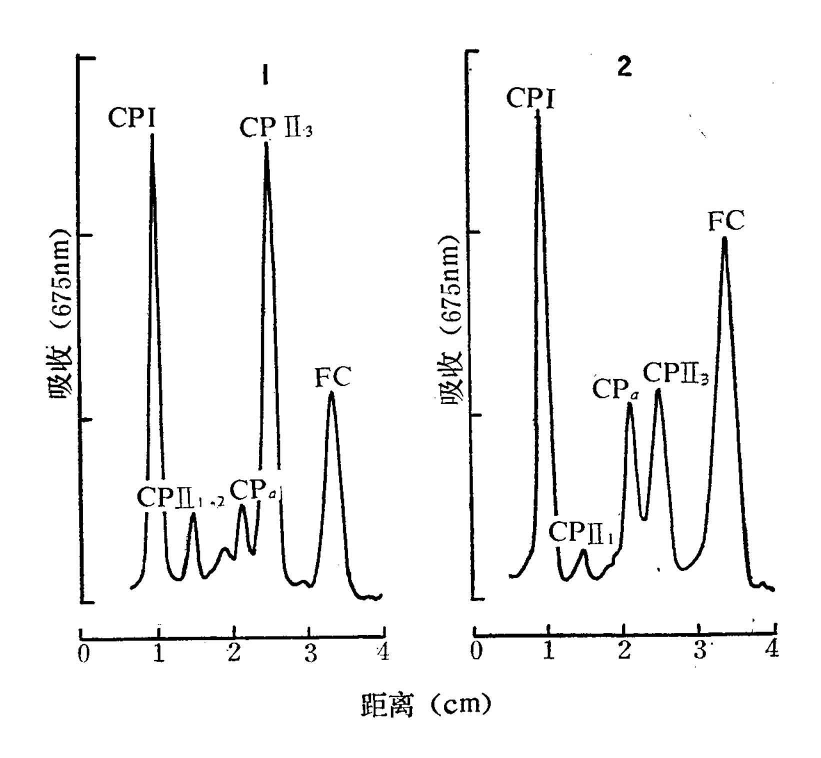



图 1　水稻叶绿体膜叶绿素蛋白质复合体凝胶电泳柱的光密度扫描

1.正常品种；2.突变体。

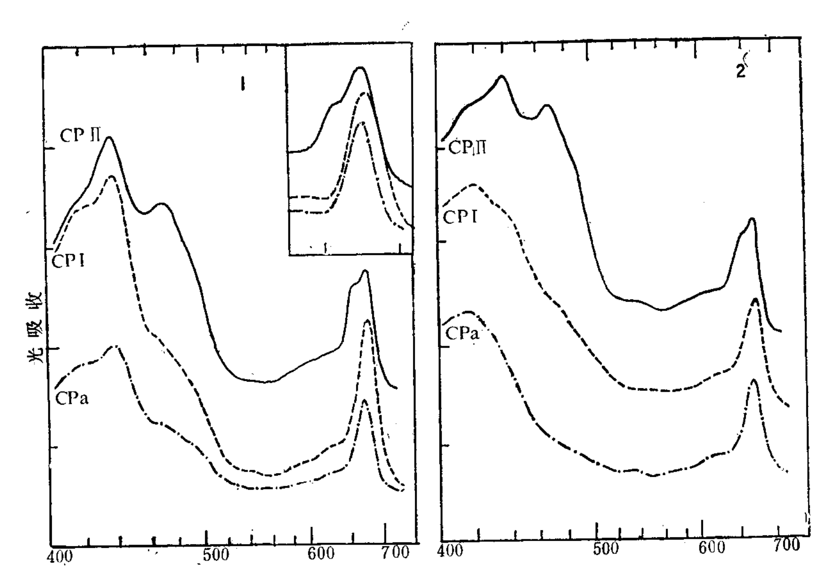



图 2　水稻叶绿体膜叶绿素蛋白质复合体 CP Ⅱ，CP Ⅰ，CPa 的吸收光谱

1.电泳后立即测定，右上角为长波区，波长标度放大一倍；　2.电泳后于20℃放置36小时再测定。

素a和b的吸收峰（图2，1），Chl a/Chl b 比值为1.1—1.3，是捕光叶绿素a/b蛋白质复合体。迁移率最大的色带 FC 呈绿黄色，是游离叶绿素带。在CPⅠ与CPⅡ—3之间有三条小带，其中CPⅡ—1和CPⅡ—2二条呈黄绿色，一般认为是CPⅡ—3的寡聚体。另一条CPa带呈兰绿色，吸收光谱仅见叶绿素a吸收峰，短波区440nm，长波区670nm，这与CPⅠ不同，该带迁移率小于CPⅡ—3，这些与Hayden等（1977）[10]和储仲稀等（1980）[15]所报导的Ⅳ带，及Anderson（1978）[7]和李桐柱等(1980)[2]所报导的CPa带相同。

突变体的凝胶电泳柱上同样分离出与上述相对应的6条色带（图1，2）。与正常叶片不同之处在于CPa带很显著而CPⅡ—3带较小。此外，其FC带比较大，而且各色带相对含量因试验条件而变化的幅度大，其原因见后节所述。

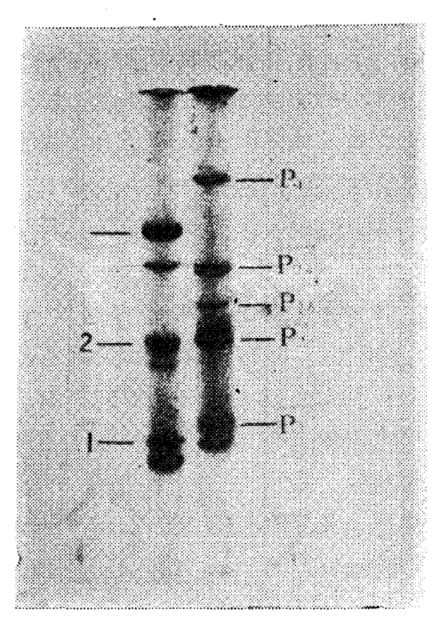



图3 水稻叶绿体膜SDS提取物凝胶电泳胶柱的蛋白质带及其分子量的测定 蛋白质样品及分子量为：1.核糖核酸酶，13700；2.胰蛋白酶，23300；3.牛血清蛋白，67000。（上面第1条横线为3）

**2.凝胶电泳柱的蛋白质带** 胶柱经考马氏兰染色显示的蛋白质带见图3，其在595nm波长的光密度扫描曲线见图4。从迁移率看，蛋白质带$P_1$与色带CPⅠ重合，P2b与CPa重合，P2c与CPⅡ—3重合，从色带的强弱看，它们之间也都各相对应。因此，$P_1$、P2b和P2c各是叶绿素蛋白质复合体CPⅠ、CPa和CPⅡ—3的蛋白质成分。蛋白质带P3迁移率小于FC色带，即FC带无相应蛋白质带。P2a带也没有与色素带对应，该带数量大，相当稳定。当将叶绿体膜SDS提取物在沸水浴中2分钟后电泳，结果是$P_1$、P2b和P2c带与色带CPⅠ、CPa和CPⅡ—3都同样消失，但P2a带仍显见。用分子量已知的蛋白质同时电泳作对比进行的分子量测定结果表明，$P_1$约为110KD，P2a为35KD、P2b为28KD，P2c为24KD，这与许多报导的结果相近[14]。

从图4可知，突变体的P2b很显著而P2c很小，与正常叶片刚相反。

**3.叶绿素蛋白质复合体的稳定性** 如图2结果所示，经电泳分离的胶柱在20°C放置36小时，色带CPⅡ—3的吸收光谱变化甚小，而CPa和CPⅠ都发生显著变化，叶绿素a在短波区的最大吸收峰由440nm移向420nm，表明叶绿素a已发生变性。显然，捕光叶绿素a/b蛋白质复合物比其他二个稳定。

稳定性的差异也见于电泳过程中各组分的含量因电泳条件不同所发生的变化。见图5，突变体凝胶柱的光密度扫描曲线因电泳时间不同（30′、60′和120′）明显变化，CPa随电泳时间增加显著减小，与此相应，FC显著增加。定量结果见表2，电泳30′，CPa组分的叶绿素占叶绿素总量的31%，FC组分占22%；电泳120′，CPa降为4.6%，FC增加到48.3%。正常叶片的CPa含量很小，虽然该组分随电泳过程减小，但对整个

光密度扫描曲线影响小，FC增加不多。显然，CPa是最不稳定的，一经分离，该复合体的叶绿素 a 就容易与蛋白质分开成为游离状态。

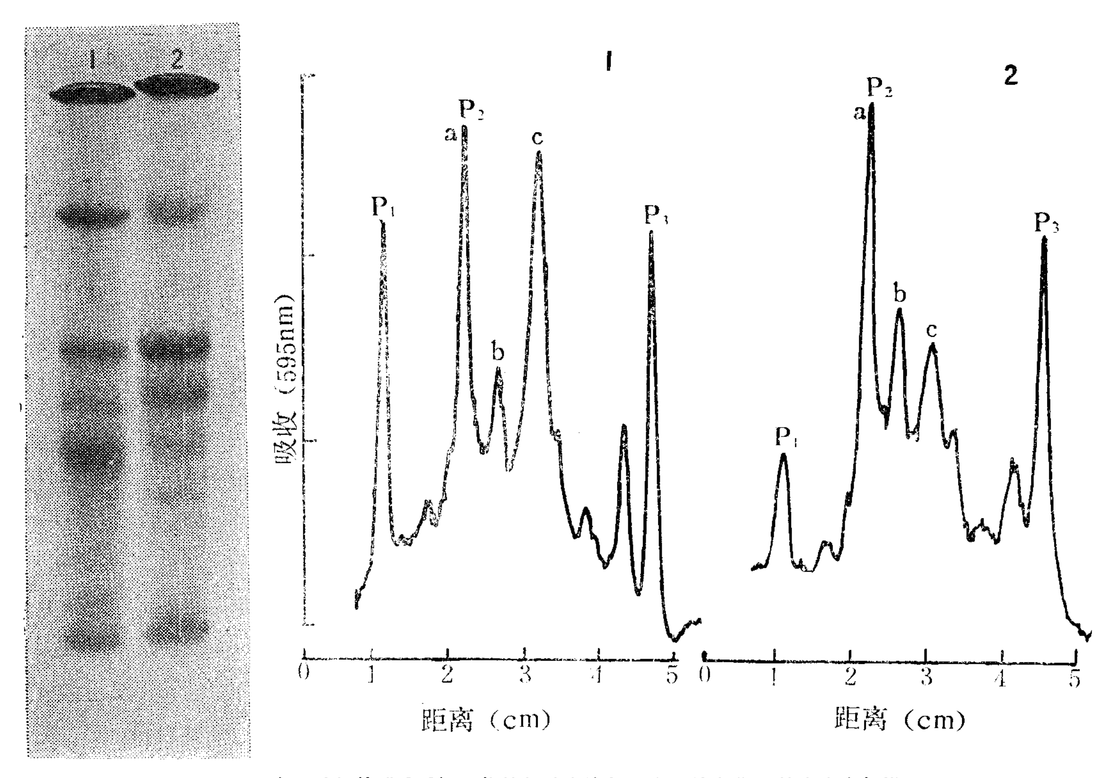



图 4　水稻叶绿体膜 SDS提取物的凝胶电泳柱蛋白质染色带及其光密度扫描

1.正常品种；2.突变体。参见图 1，蛋白质带 P1、P2b和P2c在泳动的迁移率上各与 CPⅠ、CPa和CPⅡ—3 相对应。

表 2　水稻叶绿体膜SDS增溶溶液经凝胶电泳分离的各色带的叶绿素相对含量（%）及其随电泳条件的变动

| 材料 | 组分 | 样品处理[1)] | | 电泳温度[2)] | | 电泳时间[3)] | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Ck | 50°1hr | 10° | 40° | 30′ | 120′ |
| 正常品种 | CPⅠ | 31.1 | 4.3 | 30.3 | 16.7 | 32.5 | 31.9 |
| | CPⅡ—1，2 | 4.0 | 0 | 2.5 | 0 | 1.6 | 1.0 |
| | CPa | 3.2 | 0 | 4.0 | 0 | }45.6 | 0.8 |
| | CP—3 | 37.6 | 12.0 | 35.5 | 25.0 | | 39.2 |
| | FC | 24.1 | 83.7 | 27.2 | 58.3 | 20.3 | 27.1 |
| 突变体 | CPⅠ | 32.1 | 17.6 | 29.6 | 15.2 | 35.1 | 34.8 |
| | CPⅡ—1，3 | 2.0 | 0 | 1.7 | 0 | 0.7 | 2.8 |
| | CPa | 8.7 | 0 | 30.0 | 0 | 31.0 | 4.6 |
| | CPⅡ—3 | 14.0 | 6.0 | 11.3 | 5.1 | 11.2 | 9.5 |
| | FC | 43.2 | 76.4 | 27.4 | 79.7 | 22.0 | 48.3 |

注：1）新鲜制备样品(CK)和经50℃ 1 小时处理，22℃电泳90分钟。
2）新鲜样品，在10℃和40℃电泳90分钟。
3）新鲜样品，在22℃电泳30分钟和120分钟。

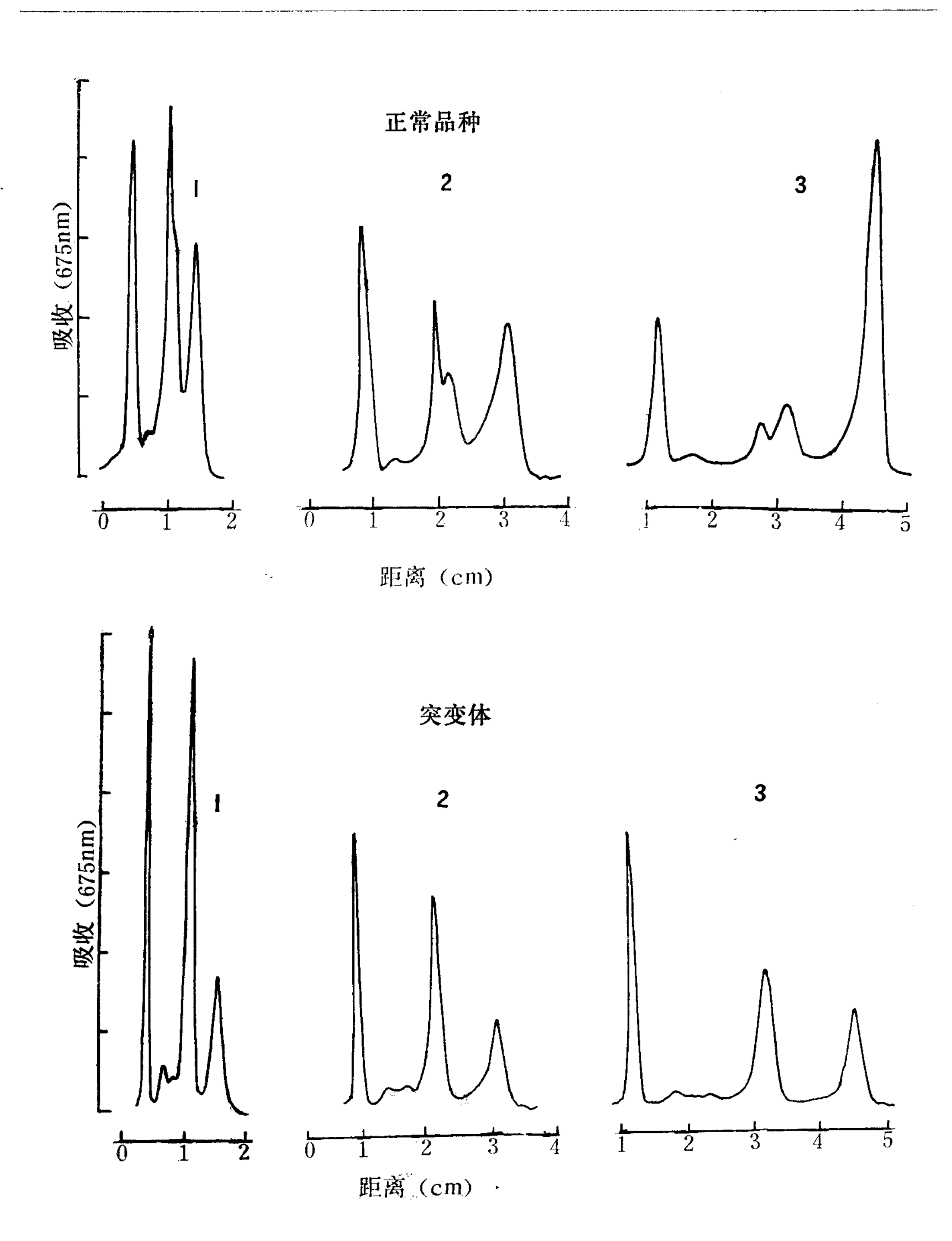



图5　水稻正常品种和突变体叶绿体膜SDS提取物电泳不同时间的凝胶柱的光密度扫描

电泳时间：1.30分；2.60分；3.120分，

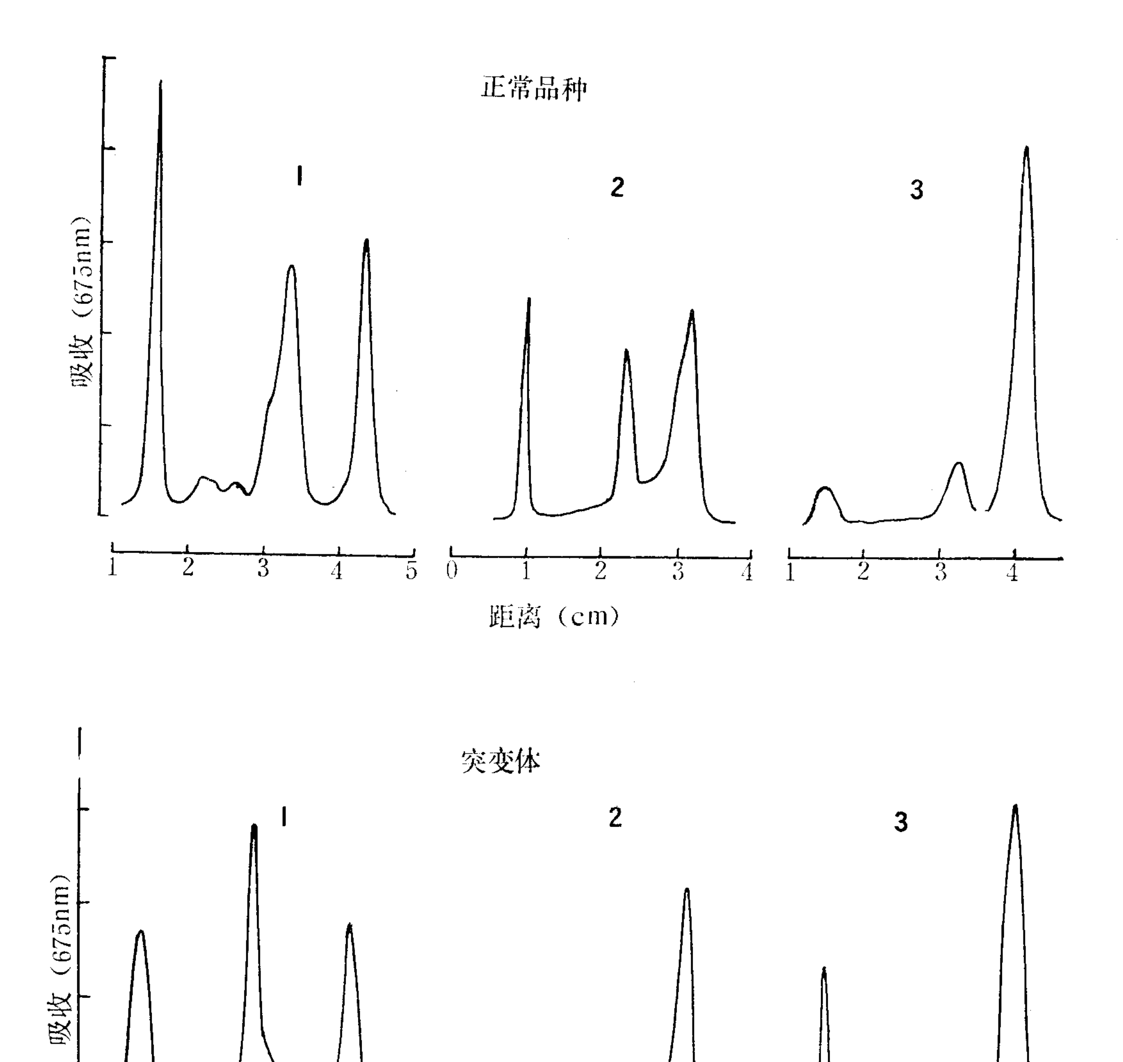



图 6　水稻正常品种和突变体叶绿体膜 SDS 提取物在不同温度下电泳的凝胶柱的光密度扫描
1.电泳温度10℃；2.电泳温度40℃；3.样品先在50℃处理 1 小时后于10℃电泳。

温度对各叶绿素蛋白质组分稳定性影响见表 2 和图 6 试验结果。电泳90分钟，突变体 CPa 中叶绿素占总量的百分数，在电泳温度12°C为30%，在22°C为8.7%，在40°C则为 0 。叶绿体膜 SDS 提取物在50°C处理 1 小时，CPa完全分解，CP Ⅰ 和 CP Ⅱ — 3 不是这样。以上结果说明，只有温和地制备和保存光合膜SDS 增溶溶液，并在较低温度下进

行较短时间电泳分离，才能较好地估计CPa组分的相对含量，而一般总是估计偏低。

# 讨 论

近年来由于叶绿体膜制备方法、SDS增溶条件和凝胶电泳技术的改进，从叶绿体膜已能分离出6—8条叶绿素蛋白质带[2][5][7][14]。多数带被鉴定为CPⅠ和CPⅡ的不同寡聚体形式。值得注意的是CPa，已证明它包含光系统Ⅱ的反应中心。本试验结果有助于澄清有关叶绿素蛋白质复合体报导中某些费解的现象。Kung与Thornber(1971)[11]观察到电泳过程中CPⅡ组分的Chl a/Chl b比值下降。一些作者测定电泳分离的CPⅡ中chl a/chl b比值往往显著大于1[13]。我们用羟基磷灰石分离黄绿色水稻突变体叶绿体膜SDS提取物时，由0.4*M*磷酸缓冲液所洗脱的CPⅡ组分叶绿素a与b比值大于3[4]。Anderson与Levine(1974)[6]认为小麦叶绿体膜有二条蛋白质带PⅡb和PⅡc与捕光Chl a/b蛋白质复合体相对应。Camm等(1890)[9]自CPⅡ组分分离出27KD和29 KD二个蛋白质结构不同的组分，前者Chl a/Chl b比值近于1，后者则远大于1。以上试验观察中出现的疑问和现象可以解释为分离的CPⅡ组分中含有CPa，而CPa又易于分解，正常的绿色植物材料，尤其是阴生植物，基粒发达，CPa含量较低，在电泳分离过程又易于分解，而且其电泳迁移率很接近CPⅡ—3，这样就较难将CPa与含量最大的捕光叶绿素a/b蛋白质复合体分开。基粒缺乏突变体则是分离制备CPa的良好材料。

有不少试验结果已表明，叶绿体的基粒容量和捕光叶绿素a/b蛋白质复合体的含量有正相关。一般认为，该组分是引起膜垛叠的主要因素[1]，它组装在垛叠膜中。缺乏基粒的水稻突变体叶绿体膜中缺乏捕光叶绿素a/b蛋白质复合体，这与上述观点一致。本试验结果中，CPⅠ的相对含量在突变体和正常品种的光合膜中比较接近（30—35%），而CPa则不同，在正常叶绿体膜中含量很低（4%），在基粒缺乏突变体中却很高(30%)，这说明，CPa主要组装在非垛叠膜中。在较高的光照条件下，以叶绿素量为基数，基粒缺乏突变体叶片有比正常叶片高的二氧化碳同化速率，其叶绿体悬液有较高的光还原活性[4]，这可以解释为突变体的叶绿体膜中有较高含量的光系统Ⅱ反应中心。

致谢 黄清藻协助胶柱光密度扫描；中国科学院植物所匡廷云、林世青同志对本文曾提出宝贵意见。

## 参 考 文 献

〔1〕 匡廷云、段续川，1980：光合膜的结构与功能。光合作用研究进展，第二集，科学出版社，1—18页。

〔2〕 李桐柱、郝迺斌、娄世庆、张其德、林世青、匡廷云，1980：叶绿体膜的结构与功能Ⅳ小麦叶绿体膜的叶绿素蛋白质复合体。植物学报，22:390—394。

〔3〕 胡忠、彭丽萍、蔡永华，1981：一个黄绿色水稻细胞核突变体。遗传学报，8：256—261。

〔4〕 胡忠、梁汉兴、彭丽萍，1981：一个黄绿色水稻突变体的光合作用特性。云南植物研究，3：449—456。

〔5〕 储钟稀、许春辉、毛大璋、赵福洪、载云玲，1980：植物叶绿素蛋白质复合物的研究Ⅰ. 阳生植物向日葵、阴生植物一叶兰的叶绿素蛋白质复合体。植物生理学报，6：163—172。

〔6〕 Anderson, J. M and R. P. Levine, 1974: The relationship between chlorophyll-protein complexes and chloroplast membrance polypeptides. *Biochem. Biophys. Acta*, 357:118—126.

〔7〕 Anderson, J. M. et al., 1978: Chlorophyll-protein complexes of spinach and barley thylakoids.

FEBS Lett., 92: 227—233.

〔8〕 Arnon, D. I. 1949: Copper enzymes in isolated chloroplast, polyphenol oxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol.*, 24: 1—15.

〔9〕 Camm, E. L and B. R. Green, 1980: Fractionation of thylakoid membranes with the nonionic detergent octyl-D-glucopyranoside. Resolution of chlorophyll-protein complex II into two chlorophyll-protein complexes. *Plant Physiol.*, 66:428—432.

〔10〕 Hayden, D. B and W. G. Hopkins, 1977: A second distinct chlorophyll a -protein complex in maize mesophyls chloroplasts. *Can. J. Bot.*, 55:2525—9.

〔11〕 Markwell, J.P., S. Reiman and J. P. Thornber; 1978: Chlorophyllprotein complexes from higher plants, a procedure for improved stability and fraction. *Arch.Biochem.Biophys.*, 190: 136—141.

〔12〕 Kung, S. D and J. P. Thornber, 1971: Photosystem I and II chlorophyll-protein complexes of higher plant chloroplasts. *Biochem. Biophys. Acta*, 253:285—289.

〔13〕 Thornber, J.P. 1975: chlorophyll-proteins: Light-harvesting and reaction center components of plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 26:127—158.

〔14〕 Wild, A., Krebs, B and W. Ruchle, 1980: Methodical studies in the separation of chlorophyll-protein complexes by polyacrylamide gel electrophoresis. *Z.pflanzephysiol.*, 100: 1—13.

# CHLOROPHYLL-PROTEIN COMPLEXES OF THE THYLAKOID MEMBRANES FROM A GRANA DEFICIENT MUTANT OF RICE

Hu Zhong

*(Kunming Institute of Botany, Academia Sinica)*

## Abstract

The comparative analysis of chl-protein complexes of the thylakoid membranes from a grana-deficient mutant and the wild variety of rice was made by using a modified procedure of electrophoretic fractionation (Markwell et al, 1978) and quantitative photodensitometric scanning. Six green bands were characterized: CP-Ⅰ, a light-harvesting chl a/b protein complex CP-Ⅱ-3(M. W. of apoprotein 24 kD) and two minor oligomers of it, a chl a-protein complex CPa (M. W. 28 kD), and FC. It was fonnd that on the basis of the relative content of chl in various bands, the amount of CP-Ⅰ is close in the membranes of wild and mutant (30—35%).However, the membranes of mutant is deficient in CP-Ⅱ-3 (10—14%) but rich in CPa (30—35%), compared to wild variety (35—40% and 4 % respectively). The CPa is most unstable of them. Most of chl of CPa was found to be dissociated during the PAGE with prolonging the duration and the increase of temperature of electrophoresis. Thus these conditions are critical for correct estimation of CPa. It was thought that the 24 kD light- harvesting chl a/b-protein complex is assembled in the stacked lamellaes but the content of 28 kD chl a-protein containing the reaction centre of PS-Ⅱ is much higher in the unstacked lamellaes than in stacked lamellaes.